

学位授与番号	甲第1565号
学位授与年月日	平成15年3月25日
氏 名	平 野 正 明
学位論文題目	Direct interaction between nucleolin and Hepatitis C Virus NS5B (C型肝炎ウイルス非構造領域 5B と核小体蛋白ヌクレオリンの相互作用に関する検討)
論文審査委員	主 査 教 授 馬 淵 宏 副 査 教 授 中 沼 安 二 教 授 中 尾 眞 二

内容の要旨及び審査の結果の要旨

慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の原因ウイルスであるC型肝炎ウイルス (HCV) の非構造領域 (NS) 5B は、RNA 依存性 RNA 合成酵素 (RdRP) であり HCV 複製の中心的な酵素である。NS5B 蛋白の細胞内局在は細胞質であるが、そのC端21アミノ酸を欠失させたNS5Btは主に核小体に局在する。一方核小体蛋白である nucleolin は、様々なウイルスの複製に関わっているとの報告がされている。今回、GFP 融合蛋白を用いて NS5B と nucleolin の局在を観察し、GST pull-down assay を用いて NS5B と nucleolin の結合に関して検討した。更に NS5B の RdRP 活性に与える nucleolin の影響に関しても検討し、以下の結果を得た。

1. GFP 融合 NS5B は核周辺の細胞質に局在し、この時内因性 nucleolin は核小体から細胞質に移動し NS5B と共局在を示した。一方 GFP 融合 NS5Bt は主に核小体で内因性 nucleolin と共局在を示した。
2. COS1 細胞を用いた GST pull-down assay の結果から NS5B 蛋白が nucleolin と特異的に結合することが確認された。
3. *In vivo*、*In vitro* の GST pull-down assay の結果から、nucleolin のC端の RNA binding domain 4 と RGG domain の両者が NS5B との結合に必要であることが確認された。
4. NS5B の clustered mutant を用いた結果から、NS5B の 208-214 アミノ酸と 500-506 アミノ酸の2領域が nucleolin との結合に重要であることが示された。これらの領域は塩基性アミノ酸に富む配列であった。
5. これらの clustered mutant の GFP 融合 NS5Bt の細胞内局在は核小体ではなく細胞質であり、この2つのアミノ酸配列が核小体局在に必要であることがわかった。
6. UMP incorporation assay による検討で、NS5B と結合する nucleolin は RdRP 活性を濃度依存性に抑制したのに対し、NS5B と結合しない nucleolin は、RdRP 活性に影響を与えなかった。

以上本研究が、ウイルス複製をターゲットとした抗ウイルス薬の開発に寄与するとともにウイルス複製のメカニズムの解明への道を開くものと判断された。